

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26249057

研究課題名(和文) 定量的がん研究のためのマルチパラメータ電子スピン共鳴イメージング法に関する研究

研究課題名(英文) Multiple functional electron paramagnetic resonance imaging for quantitative cancer studies

研究代表者

平田 拓 (Hirata, Hiroshi)

北海道大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：60250958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,600,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍内の酸素分圧およびpHを可視化する連続波電子スピン共鳴(CW-ESR)イメージング法を開発した。酸素分圧やpHを可視化するために、3次元空間の各点においてESRスペクトル情報を得る高速4次元スペクトル空間イメージング法を開発した。酸素分圧イメージングでは酸素感受性スピンプローブの緩和時間 $T_2^*$ を、pHイメージングではpH感受性スピンプローブのESRスペクトルを取得し、それぞれの情報から酸素分圧とpHを推定した。計測手法の評価のため、水溶液の模擬試料および腫瘍モデルマウスによる酸素分圧およびpHの可視化実験を行った。

研究成果の概要(英文)：We developed the methods of continuous-wave electron spin resonance (ESR) imaging for the visualization of oxygen partial pressure and pH of tumor tissues. Using accelerated four-dimensional spectral-spatial imaging, mapping of oxygen partial pressure and pH performed. ESR imaging recorded relaxation time  $T_2^*$  of oxygen-sensitive spin probes and ESR spectral lines of a pH-sensitive spin probe for oxygen mapping and pH mapping. Estimations of oxygen partial pressure and pH used those spectral parameters. Finally, we tested the developed methods with solution phantoms and tumor-bearing mice.

研究分野：計測工学

キーワード：電子スピン共鳴 酸素分圧 pH 腫瘍 イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

2012年には悪性新生物(がん)により36.1万人が亡くなっていた(人口動態調査, 厚生労働省)。これは全死亡総数の28.7%に相当する。日本では、第3次対がん総合戦略研究事業において、「進展が目覚ましい生命科学の分野との連携を一層強力に進め、がんのより深い本態解明に迫る」といった戦略目標を掲げていた。米国でも国立がん研究所の対がん戦略において、がん治療に与える要因を理解する(Understand the Factors that Influence Cancer Outcomes)ことを戦略目標の1つに設定していた。このように、日本のみならず米国や他の先進諸国において、がんのメカニズム(遺伝子から個体のレベルまで)の理解から診断・治療に渡る基礎研究や臨床研究が国家的に重要な課題と認識されていた。その中で、がん腫瘍の状態を知るために、腫瘍の生物学的情報を可視化する非侵襲的(生物に対する非破壊的)イメージング技術の進歩が必要とされていた。

### 2. 研究の目的

本課題の目的は、がん腫瘍の内部で酸素分圧 $pO_2$ と水素イオン指数pHを定量的に可視化する技術を確認し、生きたマウスの腫瘍モデルを用いて腫瘍の成長並びに放射線照射後のダイナミクスを目で見える形で画像化することであった。研究期間内に、実験小動物(マウス)の腫瘍内部のパラメータ( $pO_2$ とpH)を継続して撮像し、 $pO_2$ とpHの空間分布の動的変化を明らかにする可視化技術の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

がん腫瘍の状態を反映するバイオマーカーとして、 $pO_2$ とpHを可視化するマルチパラメータ電子スピン共鳴(ESR)イメージング法の実現を最重要課題に設定した。その実現のために、以下のサブプロジェクトを実施した。

(1) マルチパラメータ( $pO_2$ /pH) ESR 計測技術の開発

(2) 腫瘍成長に伴うダイナミクスの可視化

目的を実現するために、計測手法・可視化技術の開発については研究代表者・平田が担当し、がん腫瘍の動物実験については北海道大学・アイソトープ総合センターの安井博宣准教授(放射線生物学)が担当した。pH感受性スピンプローブについては、pH感受性化合物合成の国際的リーダーであるウエストバージニア大学V. Khrantsov教授(物理化学)に、 $pO_2$ 感受性スピンプローブについては、ロシア科学アカデミー・ノボシビルスク有機化学研究所のI. A. Kirilyuk博士にご協力頂いた。また、ESRイメージングの腫瘍への応用については、北海道大学・大学院情報科学研究科・松元慎吾准教授(磁気共鳴イメージング)から助言を受けた。

### 4. 研究成果

(1) マルチパラメータ( $pO_2$ /pH) ESR 計測技術の開発

#### ① 酸素分圧イメージング

酸素分圧 $pO_2$ を可視化するために、窒素同位体 $^{14}N$ と $^{15}N$ で標識されたニトロキシラジカルを酸素感受性スピンプローブとして使用した。図1に示すスピンプローブ $^2H$ -DCPと $^2H, ^{15}N$ -DCPを用いることにより、酸素分圧およびプローブ濃度の測定を試みた。

ニトロキシラジカルは酸素分圧に依存してESR吸収スペクトル線幅(緩和時間の逆数に比例)が変化することが知られている。同時に、ラジカル濃度もスペクトル線幅(緩和時間)に影響を与えることは周知であり、酸素分圧を測定するためには、ラジカル濃度依存性をいかに取り除くかが課題となっていた。本研究では、窒素同位体 $^{14}N$ と $^{15}N$ で標識されたニトロキシラジカルを同時に使用することにより、酸素依存性と濃度依存性を分離する計測手法を構築した。

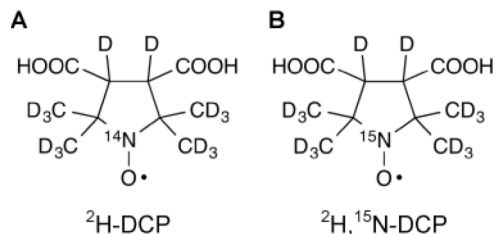


図1 酸素感受性ニトロキシラジカル

#### 計測システムの構築

ニトロキシラジカルが有する不対電子の緩和時間( $T2^*$ )の分布を3次元測定するために、連続波(CW) ESR法によるシングル・ポイント・イメージング(SPI)法の測定プログラムおよび画像再構成プログラムを開発した。SPI法については先行研究(S. Subramanian et al., Magn Reson Med 48 (2002) 370-379; K. Matsumoto et al., Magn Reson Med 50 (2003) 865-874; H. Jang et al., Magn Reson Med 70 (2013) 1173-1181)を参考にした。高速CW-ESRイメージング装置の測定シーケンスを制御するファイルをSPI用に作成し、三次元方向の磁場勾配を制御すると共に、0.1秒の磁場掃引時間によりESRスペクトルを取得した。測定の典型的なパラメータでは、XYZ方向に各15ステップの磁場勾配を印加し、合計3,375個のESRスペクトルを取得した。合計の測定時間は約7.5分であった。

#### 画像再構成システムの構築

SPI法で測定したESRスペクトルデータから緩和時間 $T2^*$ を再構成する計算プログラムを開発した。計算プログラムはFortran95でコーディングされ、空間画像再構成には3次元フーリエ変換が用いられた。図2に $^2H$ -DCPおよび $^2H, ^{15}N$ -DCP混合水溶液の3次元イメー

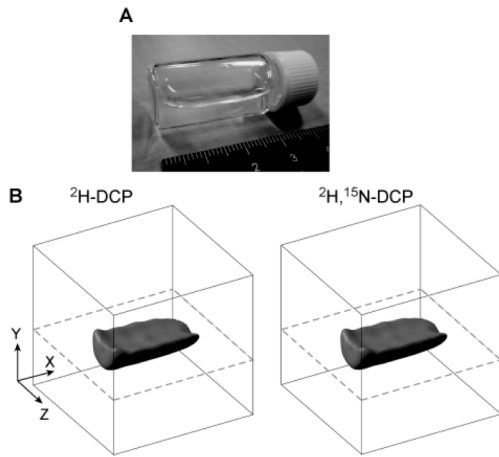


図2 窒素同位体ニトロキシルラジカルの三次元同時イメージング (A) 水溶液サンプル, (B) ESR 信号強度のサーフェイスレンダリング画像

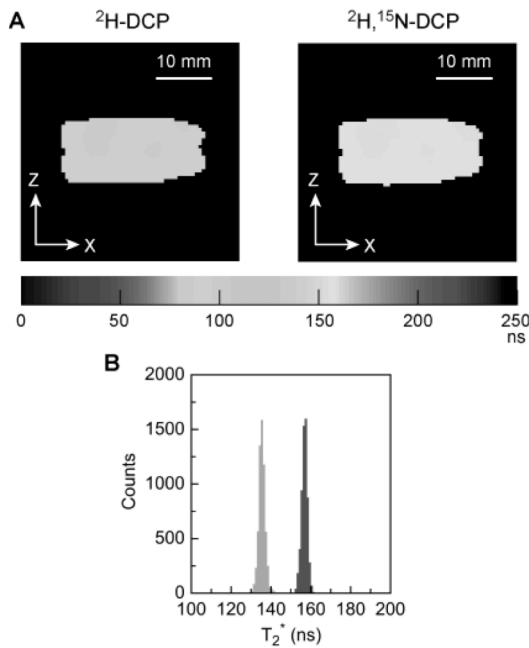


図3 緩和時間  $T_2^*$  マップ (A) 水溶液サンプル断面の  $T_2^*$  マップ (B) 緩和時間  $T_2^*$  のヒストグラム

ジングの一例を示す。何れも水溶液の形状を再現しておりラジカルの空間分布を可視化できていることが分かる。SPI 法では、信号強度の分布に加え、緩和時間を計測できる。図3に緩和時間  $T_2^*$  のマップを示す(図2の破線で示している水平断面に対応している)。二つのラジカルの緩和時間から、ESR スペクトル線幅が求められる。

#### ESR スペクトル線幅の濃度依存性、酸素分圧依存性の測定

ESR スペクトルの情報から酸素分圧および

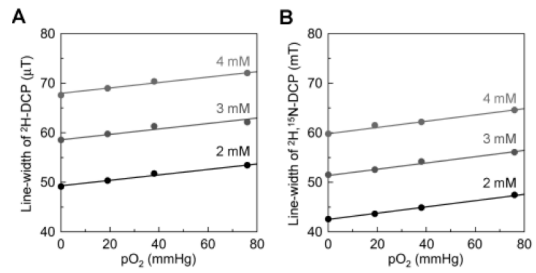


図4 窒素同位体プローブの ESR スペクトル線幅の酸素分圧依存性 (A)  $^2\text{H}$ -DCP (B)  $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -DCP (混合溶液で計測)。

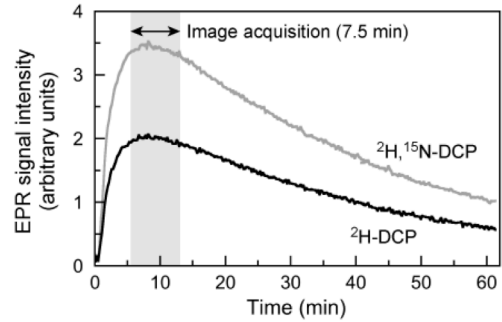


図5 マウス後肢に作製した SCC VII 腫瘍の EPR 信号の時間推移

ラジカル濃度を求めるために、ESR スペクトル線幅の校正曲線を取得した。図4に、ESR スペクトル線幅の酸素分圧依存性を示す。プローブ濃度依存性も別途測定しており、それらの校正データを用いて、酸素分圧およびプローブ濃度を算出した。

#### 腫瘍モデルマウスのイメージング実験

マウスの後肢に作製した腫瘍 (murine squamous cell carcinoma, SCC VII) を ESR イメージング法により測定した。腫瘍細胞を後肢皮下に移植し、腫瘍がある程度のサイズに成長した約1週間後にイメージング実験を行った。当初、窒素同位体ニトロキシルラジカルのマウス生体内での半減期が不明であったため、ESR 信号強度の時間推移を測定した。図5に  $^2\text{H}$ -DCP および  $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -DCP を同時に投与したマウスの後肢から測定した ESR 信号強度の時間推移を示す。ラジカル溶液はマウス尾静脈よりボラス投与された。

この実験から、用いたラジカルプローブの生体内半減期は 25 分であることが分かった (n=5)。また、投与後、プローブが腫瘍組織に十分拡散するまでの時間が 5 分、投与後 10 分で ESR 信号強度が最大となることが明らかとなった。この時の腫瘍サイズの平均値は  $0.93\text{cm}^3$  であった (n=5)。

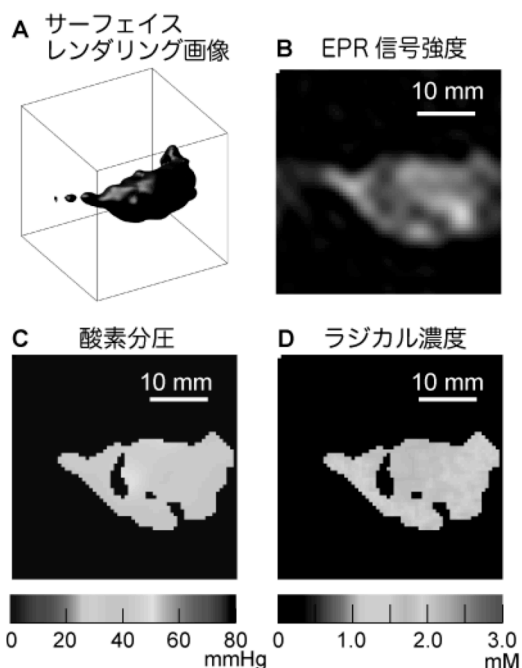


図6 マウス後肢に作製した腫瘍のイメージング画像 (A) ESR 信号強度のサーフェスレンダリング画像 (B) EPR 信号強度マップ (コロナル面) (C) 酸素分圧マップ (D)ラジカルプローブ濃度マップ

これらの実験結果をふまえ、腫瘍の酸素分圧イメージングを行った。図6に得られた酸素分圧マップの一例を示す。水溶液および腫瘍モデルマウスを用いて酸素分圧イメージングを実施したが、酸素分圧の測定精度に課題が残っている。今後、計測および計算法の各段階を精査し、酸素分圧測定の精度向上に取り組む必要がある。

## ② pH イメージング

腫瘍組織において細胞外 pH を可視化するイメージング手法を開発した。pH 感受性プローブのスペクトル変化から pH を計測する手法を 4 次元イメージング (3 次元空間+1 次元スペクトル空間) に適用し、pH の生体計測を実現した。

### pH 感受性プローブ

図7に pH 感受性ニトロキシルラジカル (R-SG) を示す。プロトンの結合により ESR スペクトル (超微細構造定数) が変化することを利用し、pH をセンシングした。

4次元 CW-ESR スペクトル空間イメージングにおいて、磁場掃引幅を一定とするデータ取得法および4次元画像再構成法を開発した (D. A. Komarov and H. Hirata, J Magn Reson 281 (2017) 45-50)。この手法を用いて、pH 感受性プローブ水溶液のイメージングを行った。2 mM R-SG 水溶液を pH=7.0, 6.8, 6.6 に調整後、内径 5.3 mm のガラス管に封入し (0.7 mL)、ESR イメージングに供した。図8にサンプルの写真、3次元画像、断面の信号強度および pH マップを示す。pH は標準偏差

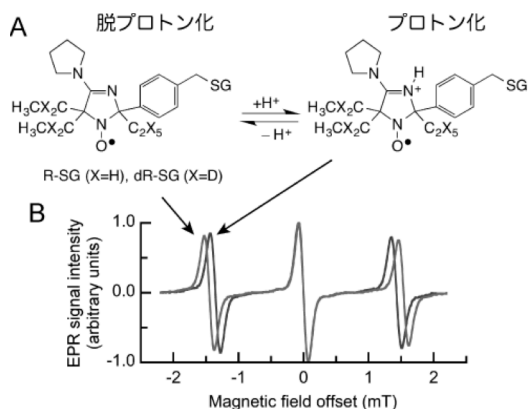


図7 pH 感受性ニトロキシルラジカルプローブ (A) プローブの化学構造 (B) ESR スペクトラム (プロトンの結合により超微細構造定数が変化する)

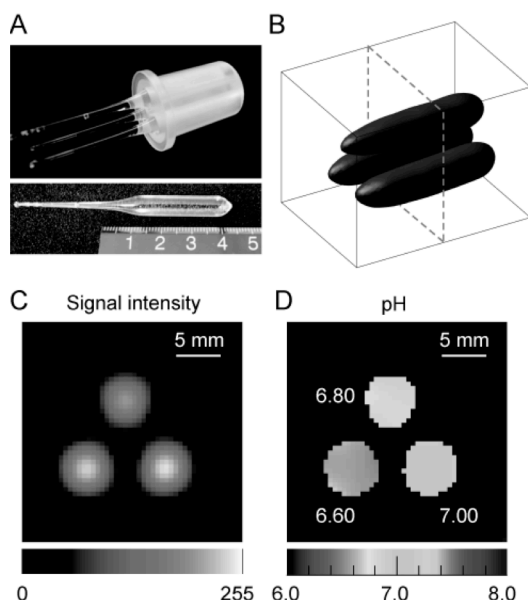


図8 水溶液の pH マッピング (A) サンプルの写真 (B) サーフェスレンダリング画像 (C) 中央断面の ESR 信号強度マップ (D) 中央断面の pH マップ

0.04 以下の精度で求められており、平均値の誤差は最大 0.04 pH units であった。これらの検証結果から、pH の分解能は 0.1 pH units と推定された。

## (2) 腫瘍成長に伴うダイナミクスの可視化

マウス後肢に SCC VII 腫瘍細胞を移植し、5 日目と 8 日目の細胞外 pH を測定した。pH 感受性プローブには、R-SG を重水素化した dR-SG プローブを用いた。その理由は、高い信号強度が得られること、ESR スペクトルがシャープで pH によるスペクトルの変化が大きくなることが上げられる。dR-SG 溶液をマウスの尾静脈から投与後、2 分間待機し、信号強度が大きくなったタイミングで ESR のデータ取得を開始した。3次元 pH イメージングを行った後、動物用 1.5T MRI により腫瘍部の解

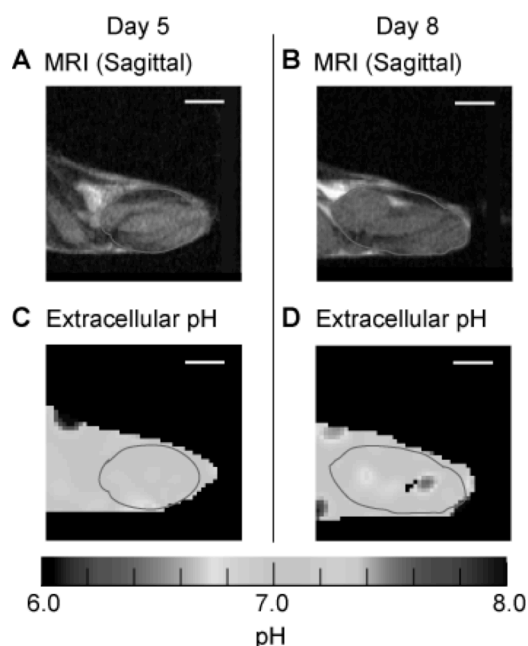


図9 腫瘍組織の pH マッピング (A), (B) 後肢の MRI 画像 (C), (D) 細胞外 pH マップ、スケールバーは 5 mm.

剖学的画像を取得した。図9に5日目と8日目の MRI 画像および pH マップを示す。線で囲われた部分が腫瘍である。図9より、腫瘍の成長に伴い、pH が低下する様子が見られる。この現象は腫瘍組織のアシドーシスとして従来から知られているが、3次元的に pH のダイナミクスが可視化された例は少なく、今後の研究のイメージングツールとして大いに期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- 1) R. Nakaoka, D. A. Komarov, S. Matsumoto, and H. Hirata. Impact of the characteristic impedance of coaxial lines on the sensitivity of a 750-MHz electronically tunable EPR resonator. *Applied Magnetic Resonance*, 査読有 (2018). doi: 10.1007/s00723-018-1001-6
- 2) T. Amida, R. Nakaoka, D. A. Komarov, K. Yamamoto, O. Inanami, S. Matsumoto, and H. Hirata. A 750-MHz electronically tunable resonator using microstrip line couplers for electron paramagnetic resonance imaging of a mouse tumor-bearing leg. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 査読有, Vol. 65, No. 5, pp. 1124-1132 (2018). doi: 10.1109/TBME.2017.2743232
- 3) D. A. Komarov and H. Hirata. Fast

backprojection-based reconstruction of spectral-spatial EPR images from projections with the constant sweep of a magnetic field. *Journal of Magnetic Resonance*, 査読有, Vol. 281, pp. 45-50 (2017), doi:

10.1016/j.jmr.2017.05.005

- 4) H. Kubota, D. A. Komarov, H. Yasui, S. Matsumoto, O. Inanami, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov, and H. Hirata. Feasibility of in vivo three-dimensional  $T_2^*$  mapping using dicarboxy-PROXYL and CW-EPR-based single-point imaging. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 査読有, Vol. 30, No. 3, pp. 291-298 (2017), doi: 10.1007/s10334-016-0606-8
- 5) A. Enomoto, K. Saito, S. Subramanian, M. C. Krishna, H. Hirata, and N. Devasahayam. Passive decoupling due to low Q-factors of four-channel coils in 300-MHz pulsed EPR imaging. *Applied Magnetic Resonance*, 査読有, Vol. 46, No. 6, pp. 671-683 (2015), doi: 10.1007/s00723-015-0671-6
- 6) W. Takahashi, Y. Miyake, and H. Hirata. Artifact suppression in electron paramagnetic resonance imaging of  $^{14}\text{N}$ - and  $^{15}\text{N}$ -labeled nitroxyl radicals with asymmetric absorption spectra. *Journal of Magnetic Resonance*, 査読有, Vol. 247, pp. 31-37 (2014), doi: 10.1016/j.jmr.2014.08.001

[学会発表] (計19件)

- 1) H. Kubota, D. A. Komarov, S. Matsumoto, K. Yamamoto, H. Yasui, O. Inanami, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov, H. Hirata. Three-dimensional oxygen mapping using a pair of isotopic nitroxyl radicals and CW-EPR-based single-point imaging. EPR 2017: International Conference on Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy and Imaging of Biological Systems (2017).
- 2) D. A. Komarov, H. Hirata. Fast backprojection-based reconstruction of spectral-spatial EPR images from projections with the constant sweep of a magnetic field. EPR 2017: International Conference on Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy and Imaging of Biological Systems (2017).
- 3) 久保田晴江, 安井博宣, 松元慎吾, 稲波修, Igor A. Kirilyuk, Valery V. Khramtsov, 平田拓. 窒素同位体標識ニトロキシラジカルによる腫瘍モデルマ

- ウスの酸素分圧イメージング. 第 56 回電子スピンサイエンス学会年会 (2017).
- 4) 市川裕貴, Denis A. Komarov, 山本久美子, 稲波修, 松元慎吾, 平田拓. 電子常磁性共鳴分光による腫瘍組織の pH マッピング法の開発. 第 56 回電子スピンサイエンス学会年会 (2017).
  - 5) 中岡梨々子, 平田拓. 腫瘍モデルマウス用 750MHz チューナブル共振器の最適設計. 第 56 回電子スピンサイエンス学会年会 (2017).
  - 6) H. Kubota, H. Yasui, S. Matsumoto, O. Inanami, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov, H. Hirata. CW-EPR-based oxygen mapping technique using a pair of isotopic nitroxyl radicals. Xth International Workshop on EPR in Biology and Medicine (2016).
  - 7) H. Hirata, H. Kubota, H. Yasui, S. Matsumoto, O. Inanami, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov. Development of a CW-EPR-based oxygen-mapping technique using a pair of isotopic nitroxyl radicals. Asia-Pacific EPR/ESR Symposium 2016 (2016).
  - 8) H. Hirata, H. Kubota, H. Yasui, S. Matsumoto, O. Inanami, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov. Feasibility study of a CW-EPR-based oxygen mapping technique using a pair of isotopic nitroxyl radicals. 58th Annual Rocky Mountain Conference on Magnetic Resonance (39th International EPR Symposium) (2016).
  - 9) H. Kubota, H. Yasui, S. Matsumoto, O. Inanami, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov, H. Hirata. Characteristics of <sup>14</sup>N- and <sup>15</sup>N-labeled dicarboxy-PROXYLs as oxygen-sensitive probes for CW-EPR-based single-point imaging (SPI). 58th Annual Rocky Mountain Conference on Magnetic Resonance (39th International EPR Symposium) (2016).
  - 10) 編田竜也, 松元慎吾, 平田拓. マイクロ波シミュレーションによる 750 MHz EPR 共振器の磁場発生効率の最適化. 第 55 回電子スピンサイエンス学会年会 (2016).
  - 11) 長谷川昂平, 松元慎吾, 平田拓. 高速 EPR シングル・ポイント・イメージング法における部分 k 空間データ取得の緩和時間 T2\*マッピングへの影響評価. 第 55 回電子スピンサイエンス学会年会 (2016).
  - 12) 市川裕貴, 平田拓. EPR 分光による pH 推定アルゴリズムの開発. 第 55 回電子スピンサイエンス学会年会 (2016).
  - 13) 安田雄介, 久保田晴江, 松元慎吾, 平田拓. CW-EPR 法による酸素分圧及びプロ
- ブ濃度定量化計測の実現可能性検証. 第 54 回電子スピンサイエンス学会年会 (2015).
- 14) 長谷川昂平, 松元慎吾, 平田拓. 部分 k 空間取得による高速 EPR シングル・ポイント・イメージング法の実験. 第 54 回電子スピンサイエンス学会年会 (2015).
  - 15) 編田竜也, 平田拓. マイクロストリップラインの結合を利用して共振周波数の調整を行う 750 MHz EPR 共振器の開発. 第 54 回電子スピンサイエンス学会年会 (2015).
  - 16) 久保田晴江, 安井博宣, 松元慎吾, 三宅祐輔, 稲波修, Igor A. Kirilyuk, Valery V. Khramtsov, 平田拓. 酸素感受性同位体ニトロキシラジカルの特性評価実験. 第 54 回電子スピンサイエンス学会年会 (2015).
  - 17) T. Ishii, H. Hirata. Simulation of RF magnetic fields in crossed loop resonators for 300 MHz pulsed EPR. Joint conference of 9th Asia/Pacific EPR/ESR Symposium, 1st International EPR (ESR) Society Symposium, and 53rd SEST Annual Meeting (2014).
  - 18) W. Takahashi, Y. Miyake, H. Hirata. Artifact suppression in electron paramagnetic resonance imaging of <sup>14</sup>N- and <sup>15</sup>N-labeled nitroxyl radicals with asymmetric absorption spectra. Joint conference of 9th Asia/Pacific EPR/ESR Symposium, 1st International EPR (ESR) Society Symposium, and 53rd SEST Annual Meeting (2014).
  - 19) J. Goodwin, K. Yachi, M. Nagane, H. Yasui, Y. Miyake, O. Inanami, A. A. Bobko, V. V. Khramtsov, H. Hirata. Electron paramagnetic resonance spectroscopy for in vivo measurement of tumour extracellular pH: the effect of X-ray irradiation. Proceedings of Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB 2014 (2014).
- [その他]  
ホームページ等  
<http://www.ist.hokudai.ac.jp/lab/mre/index-j.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
平田 拓 (HIRATA, Hiroshi)  
北海道大学・大学院情報科学研究科・教授  
研究者番号：6 0 2 5 0 9 5 8
  - (2) 研究分担者  
安井 博宣 (YASUI, Hironobu)  
北海道大学・アイソトープ総合センター・准教授  
研究者番号：1 0 5 7 0 2 2 8